



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **05137582 A**(43) Date of publication of application: **01.06.93**

(51) Int. Cl. **C12N 15/57**
C12N 9/48

(21) Application number: **03328163**(22) Date of filing: **15.11.91**(71) Applicant: **TOYOBO CO LTD**(72) Inventor: **TSURU ONORI**
YOSHIMOTO TADASHI

(54) **DNA HAVING GENETIC INFORMATION ON
PYROGLUTAMYL AMINOPEPTIDASE AND ITS
USE**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject DNA, capable of coding an amino acid sequence of a polypeptide containing a pyroglutamyl aminopeptidase and producing the high-purity pyroglutamyl aminopeptidase useful as a reagent for research, etc., with high productivity.

CONSTITUTION: *Bacillus amyloliquefaciens* IFO 14141 is cultured in a culture medium at 37°C overnight by shaking culture and the bacterial cell is then collected by centrifugation and suspended in a 50mM tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris) hydrochloride

buffer solution (pH 8.0). A lysozyme, a surfactant, etc., are added to carry out bacteriolysis. A solution of chloroform- phenol is then added to centrifuge the solution. An aqueous layer is collected and precipitated with ethanol to recover a DNA, which is then treated with a restriction enzyme, bound to a vector and transduced into *Escherichia coli* to perform transformation. The obtained transformant is cultured to select a clone capable of producing a pyroglutamyl aminopeptidase. The DNA is recovered from the clone and treated with a restriction enzyme to afford the objective DNA coding the amino acid sequence of a polypeptide containing the pyroglutamyl aminopeptidase.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-137582

(43)公開日 平成 5 年(1993) 6 月 1 日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/57		7823-4B		
9/48		8828-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全 6 頁)

(21)出願番号	特願平3-328163	(71)出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号
(22)出願日	平成 3 年(1991)11月15日	(72)発明者	鶴 大典 長崎市白鳥町10番16号
		(72)発明者	芳本 忠 長崎市滑石町 2 丁目29番10号

(54)【発明の名称】 ピログルタミルアミノペプチダーゼの遺伝情報を有するDNAおよびその用途

(57)【要約】

【目的】 ピログルタミルアミノペプチダーゼを効率的に生産する製造法を提供する。

【構成】 ピログルタミルアミノペプチダーゼを含むポリペプチドのアミノ酸配列をコードしているDNA、DNAを含有する組み換えベクター、宿主細胞を該組み換えベクターで形質転換した形質転換体および該形質転換体を培養して、ピログルタミルアミノペプチダーゼを生産させ、次いで該ピログルタミルアミノペプチダーゼを採取することを特徴とするピログルタミルアミノペプチダーゼの製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ピログルタミルアミノペプチダーゼを含むポリペプチドのアミノ酸配列をコードしているDNA。

【請求項2】 DNAが配列表の配列番号1に記載された塩基配列及び該ポリペプチドと機能的同等物をコードする請求項1記載のDNA。

【請求項3】 請求項1のDNAを含有する組み換えベクター。

【請求項4】 宿主細胞を請求項3の組み換えベクターで形質転換した形質転換体。

【請求項5】 請求項4の形質転換体を培養して、ピログルタミルアミノペプチダーゼを産生させ、次いで該ピログルタミルアミノペプチダーゼを採取することを特徴とするピログルタミルアミノペプチダーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はピログルタミルアミノペプチダーゼ（以下PGPと記載）の遺伝情報を有するDNA、該DNAを含有する組み換えベクター、該組み換えベクターを用いて得られる形質転換体および該形質転換体により該DNAの遺伝情報を発現せしめて得られるPGPの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】PGP (Pyroglutamyl aminopeptidase, EC 3. 4. 19. 3) は、タンパク質、ペプチド、アミノ酸のアミノ末端レーピログルタミン酸残基を特異的に遊離する酵素であり、種々の動物の脳、肝、血清や脳下垂体及び植物、微生物にも広く存在することが知られている。（蛋白質核酸酵素、25、490～499（1980））

【0003】タンパク質やペプチドには、アミノ末端がレーピログルタミン酸残基で保護されているものが多数存在し、またタンパク質一次構造決定の際、タンパク質やペプチドが加水分解され、生じた新しいアミノ末端グルタミンが、非酵素的に閉環してピログルタミン酸残基が形成される。

【0004】よってPGPはタンパク質一次構造決定に非常に有用な酵素である。従来PGPは、例えばバチルス アミロリクイファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) より分離・精製されている。（*Biochimica et Biophysica Acta*, 791, 117～122（1984））

【0005】

【発明が解決しようとする問題】従来より報告されているPGP生産菌は、PGPの生産性が低く製造コスト的に高価になるという難点があるだけでなく、共存する他種酵素等の除去が非常に困難で、純度の高い良質なPGPを得るため、精製コストが非常に高いものとなり、研

究用試薬として安易に広く用いるには必ずしも満足のいくものではなかった。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、該PGPの生産性向上を計るべく鋭意検討を試みたところ、該PGP遺伝子の採取ならびに一次構造解析に成功すると共に遺伝子工学的手法を応用することによって、以下に述べる如く、高生産性である製造法を確立した。

【0007】すなわち、本発明の要旨はPGPを含むポリペプチドのアミノ酸をコードしているDNA、該DNAを含有する組み換えベクター、宿主細胞を該組み換えベクターで形質転換した形質転換体及び該形質転換体を培養してPGPを産生させ、次いで該PGPを採取することを特徴とするPGPの製造法に存する。

【0008】本発明の上記DNAとしては、例えば配列表の配列番号1に記載された塩基配列を有するDNAを挙げることができる。なお、本発明のDNAは遺伝子組み換え技術により、基本となるDNAの特定部位に、該DNAがコードするものの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善するように人為的に変異を起こさせたものも含むものである。

【0009】PGP遺伝子の供与体である微生物としては、PGP産生能を有する微生物であれば良く、例えばバチルス アミロリクイファシエンスが好適である。また、遺伝子組み換え技術を駆使してPGP産生能を付与せしめた形質転換微生物もPGP遺伝子の供与体として利用してもよい。

【0010】本発明のDNAは、例えばPGPを生産するPGP遺伝子の供与体である微生物より、該微生物のDNAを分離・精製した後、超音波、制限酵素などを用いてDNAを切断したものとリニヤな発現ベクターとを両DNAの平滑または接着末端部においてDNAリガーゼなどにより結合閉環させ、こうして得られた組み換えDNAベクターを複製可能な宿主微生物に移入した後、ベクターのマーカーとPGPの活性とを指標として、スクリーニングして取得した該組み換えDNAベクターを保持する微生物を培養し、該培養菌体から該組み換えDNAベクターを分離・精製し、次いで該組み換えDNAベクターからPGP遺伝子であるDNAを採取すればよい。

【0011】以下に上記採取方法をより詳細に説明する。遺伝子の供与体である微生物に由来するDNAは次の如くにして採取される。すなわち、供与微生物である上述した細菌のいずれかを例えば液体培地で約1～3日間通気攪拌培養し、得られる培養物を遠心分離して集菌し、次いでこれを溶菌させることによってPGP遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌方法としては例えばリゾチームやβ-グルカナーゼなどの細胞壁溶解酵素による処理が施され、必要によりプロテアーゼなどの他の酵素やラウリル硫酸ナトリウムなどの界面活性

剤が併用され、さらに細胞壁の物理的破壊法である凍結融解やフレンチプレス処理を上述の溶菌法との組み合わせで行ってもよい。

【0012】この様にして得られた溶菌物からDNAを分離・精製するには常法に従って例えばフェノール抽出による除蛋白処理、プロテアーゼ処理、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈澱遠心分離などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

【0013】分離・精製された微生物DNAを切断する方法は、例えば超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができるが、得られるDNA断片とベクターとの結合を容易ならしめるため制限酵素とリわけ特定ヌクレオチド配列に作用する例えばEcoRI, HindIII, BamHIなどのIII型制限酵素が適している。

【0014】ベクターとしては、宿主微生物で自律的に増殖しうるファージまたはプラスミドから遺伝子組み換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、例えばエシェリシア コリー (Escherichia coli) を宿主微生物とする場合には、 λ gt \cdot 10, λ gt \cdot 11などが使用できる。

【0015】また、プラスミドとしては、例えばエシェリシア コリーを宿主微生物とする場合にはpBR322, pBR325, pACYC 84, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19などが、バチルス サブチリス (Bacillus subtilis) を宿主微生物とする場合にはpUB110, pC194などが使用でき、さらにエシェリシア コリーおよびバチルスサブチリスなどのグラム陰陽性にまたがる二種以上の宿主微生物で自律的に増殖可能なシャトルベクターを利用することもできる。このようなベクターを、先に述べたPGP遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同じ制限酵素で切断して、ベクター断片を得ることが望ましい。

【0016】微生物DNA断片とベクター断片とを結合させる方法は、公知のDNAリガーゼを用いる方法であればよく、例えば微生物DNA断片の接着末端とベクター断片の接着末端とのアニーリングの後、適当なDNAリガーゼの使用により微生物DNA断片とベクター断片との組み換えDNAを作成する。必要ならば、アニーリングの後、宿主微生物に移入して、生体内のDNAリガーゼを利用し、組み換えDNAを作成することもできる。

【0017】宿主微生物としては、組み換えDNAが安定かつ自律的に増殖可能で、且つ外来性DNAの形質が発現のできるものであればよく、例えば宿主微生物がエシェリシア コリーDH, エシェリシア コリーHB101, エシェリシア コリーW3110, エシェリシア コリーC600, エシェリシア コリーJM109などが利用できる。

【0018】宿主微生物に組み換えDNAを移入する方

法としては、例えば宿主微生物がエシェリシア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組み換えDNAの移入を行い、またバチルス属に属する微生物の場合には、コンピテントセル法またはプロトプラスト法などを採用することができ、さらにマイクロインジェクション法を用いても良い。こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより多量のPGPを安定して産生し得ることを見出した。

【0019】宿主微生物への目的組み換えDNA移入の有無についての選択は、目的組み換えDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカーとPGPとを同時に発現し得る微生物を検索すればよく、例えば薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつPGPを生成する微生物を選択すればよい。好ましくは、選択培地に生育したコロニーについて基質としてピログルタミル- β -ナフチルアミド (Pyroglutamy- β -Naphthylamide) を用い、PGP活性を指標に酵素遺伝子の入った組み換えDNAをスクリーニングする。

【0020】上述の方法により得られたPGP遺伝子の塩基配列はサイエンス (Science), 214, 1205~1210 (1981) に記載されているジデオキシ法で解読し、またPGPのアミノ酸配列は塩基配列より推定した。この様にして一度選択されたPGP遺伝子を保有する組み換えDNAは、形質転換微生物から取り出され、他の宿主微生物に移入することも容易に実施できる。また、PGP遺伝子を保持する組み換えDNAから制限酵素などにより切断して、PGP遺伝子であるDNAを切り出し、これを同様な方法により切断して得られるベクター断片とを結合させて、宿主微生物に移入することも容易に実施できる。

【0021】形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は液体培養で行うが、工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

【0022】培養温度は菌が発育し、PGPを生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリシア コリーの場合、好ましくは20~42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、PGPが最高収量に達する時

期を見計らって適当な時期に培養を終了すれば良く、通常は12~48時間程度である。培地pHは菌が発育し、PGPを生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH6.0~8.0程度である。

【0023】培養物中のPGPは菌体を含む培養液をそのまま採取し利用することもできるが、一般には常法に従ってPGPが培養液中に存在する場合には濾過、遠心分離などにより、PGP含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。PGPが菌体内に存在する場合には、得られた培養物を濾過または遠心分離などの手段により、菌体を採取し次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤および／または界面活性剤を添加してPGPを可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0024】この様にして得られたPGP含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈澱せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。吸着剤あるいはゲル濾過剤などによるゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーにより、精製されたPGPを得る。

【0025】

【実施例】以下、実施例で本発明を詳細に説明する。

実施例1〔染色体DNAの分離〕

バチルス アミロリクイファシエンシ IF014141の染色体DNAを次の方法で分離した。同菌株を150mlの普通ブイヨン培地で37℃一晩振盪培養後、遠心(8000rpm, 10分)により集菌した。

【0026】10%シュクロース50mMトリス塩酸(pH8.0)、50mM EDTAを含んだ溶液5mlに懸濁させ、1mlのリゾチーム溶液(10mg/ml)を加えて37℃、15分間保温し、次いで1mlの10%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)溶液を加えた。この懸濁液に等量のクロロホルム・フェノール溶液(1:1)を加え、攪拌混合し、10,000rpm、3分間の遠心で水層と溶媒層に分け、水層を合取した。この水層に2倍量のエタノールを静かに重層し、ガラス棒でゆっくり攪拌しながらDNAをガラス棒にまきつけて分離した。これを10mMトリス塩酸(pH8.0)、1mM EDTAを含んだ溶液(以下TEと記載)で溶解した。これを等量のクロロホルム・フェノール溶液で処理後、遠心により水層を分取し、2倍量のエタノールを加えて、上記の方法でもう一度DNAを分離し2mlのTEで溶解した。エシェリシア コリーHB101、エシェリシア コリーJM109のコンピテントセルはHanahanの方法により作成し、ライブラリー作成の宿主として用いた。

【0027】実施例2〔PGPをコードする遺伝子を含有するDNA断片及び該DNA断片を有する組み換えベクターの調製〕

実施例1で得たDNA1μgを制限酵素EcoR(東洋紡製)10ユニットで37℃、1時間反応させ完全に分解した後、同様にしてEcoRで切断したpBR322 0.5μgにT4-DNAリガーゼ(東洋紡製)1ユニットで16℃、12時間反応させDNAを連結した。連結したDNAは、エシェリシアコリーHB101のコンピテントセルを用いて形質転換した。使用したDNA1μg当り約1×10⁶個の形質転換体のコロニーが得られた。得られたコロニーは50μg/mlアンピシリン入りN培地(1%ポリペプトン、1%肉エキス、0.5%塩化ナトリウム)で37℃で18時間培養し、菌体破碎液を用いて以下の方法によりPGP活性を測定した。

【0028】(試薬)

- A. 0.1M カリウムーリン酸緩衝液(pH8.0)
- B. 20mM ピログルタミルβ-ナフチルアミドメタノール溶液
- C. 25% トリクロロ酢酸溶液
- D. 0.15% 亜硝酸ナトリウム溶液
- E. 0.5% 硫酸アンモニウム溶液
- F. 0.05% N-1-ナフチルエチレンジアミン溶液

【0029】(方法) A液0.8mlに酵素液0.1mlを加え、37℃に保温する。3分後B液0.1mlを加え、37℃で10分間反応させる。その後C液1mlを加え、反応を止める。上清1mlにD液1mlを加え、遊離したナフチルアミンをジアゾ化し、3分後、過剰の亜硫酸を分解するためE液を1ml加え、更にF液2mlを加え、37℃に放置する。30分後、570nmの吸光度を測定する。酵素活性の1単位は、この条件下で1分間当り1μmolのβ-ナフチルアミンを遊離する酵素量とした。

【0030】上記方法により約2,000個のコロニーのPGP活性を測定したところ、2個のPGP活性を有するコロニーを得た。これらの保有するプラスミドには約2.1kbpの挿入DNA断片が存在しており、このプラスミドをpBPG-Rとした。次いでpBPG-Rより約2.1kbpの挿入DNA断片をEcoRで切り出しpUC18へ導入してpBPG1及びpBPG2を構築した。pBPG1及びpBPG2でエシェリシア コリーJM109を形質転換したところ、エシェリシア コリーHB101(pBPG-R)と比較し、それぞれ12.5倍、2倍のPGP生産性の向上が見られた。(図1)

【0031】実施例3〔塩基配列の決定〕

pBPG1の約2.1kbpのEcoR断片につい

て、TAKARA k-ilo sequence deletion kitを用いてdeletion mutantの作製を行った。deletion mutantは常法に従い一本鎖DNAとし、得られた一本鎖DNAについて、M13シーケンシングキット (M13 Sequencing kit、東洋紡製) を用いて、塩基配列の決定を行った。決定した塩基配列及びアミノ酸配列を配列表1に示した。

【0032】実施例4〔PGPの製造〕

前記のN培地61を101ジャーファメンターに分注し、121℃、15分間オートクレーブを行い放冷後、50mg/mlアンピシリン(ナカライテスク製)を6ml添加した。この培地に上記と同一組成の培地で予め37℃で18時間振盪培養したエシェリシア コリーJ M109 (pBPG1)の培養液60mlを接種し、37℃で18時間通気攪拌培養した。培養終了後のPGP活性は、4.2 unit/mlであった。培養液61を遠心分離にて集菌し、50mM K-リン酸緩衝液(pH8.0)200mlに懸濁し、常法により超音波破碎した後、15,000rpmで20分間遠心分離してPGPの粗酵素液を得た。

【0033】このようにして得た粗酵素液にプロタミンを用いて処理を施した後、硫酸アンモニウムを用いた塩析分画を行った。塩析沈澱物を50mlの50mM K-リン酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、Toyopearl HW-65C(東ソー)クロマトグラフィーに

供して、PGP活性画分を得た。この活性画分を限外濾過機にて濃縮した後、Sephadex G-150にてゲル濾過し、純化されたPGPを得た。収率は35%であった。

【0034】

【発明の効果】本発明によって、PGP遺伝子の塩基配列およびPGPのアミノ酸配列が明らかになり、また遺伝子工学的的手法による効率的なPGPの製造法を提供した。また本発明のPGP遺伝子と種々の遺伝子工学的手法とを用いることにより、より効率的なPGPの製造法をもたらしめるものである。

【0035】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：895

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：バチルス アミロリクイファシエンス(Bacillus amyloliquefaciens)

株名：IFO14141

配列の特徴

68~72 S RBS

81~728 P CDS

配列

GAATTC	AAGA	CATGTTTCCC	CCTTCGGCAG	GAATATATGT	CCATTATAGA	GTATGGTAAA	60
AAGAAA	AGGA	GGGTTTTTTG					80
ATG	GAG	AAA	AAA	GTA	TTG	CTT	ACA
Met	Glu	Lys	Lys	Val	Leu	Leu	Thr
1		5		10		15	
ACG	GTC	AAT	CCT	TCA	TGG	GAA	GCG
Thr	Val	Asn	Pro	Ser	Trp	Glu	Ala
		20		25		30	
GAA	GGC	CCC	GCC	TCT	ATC	GTA	TCC
Glu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ile	Val	Ser
		35		40		45	
AAG	TCC	CTT	GCC	GTG	CTG	CGC	GAG
Lys	Ser	Leu	Ala	Val	Leu	Arg	Glu
		50		55		60	
ATT	ATC	ATC	TGT	GTC	GGA	CAG	GCG
Ile	Ile	Ile	Cys	Val	Gly	Gln	Ala
		65		70		75	
GAA	CGG	GTC	GCG	ATC	AAT	CTG	AAT
Glu	Arg	Val	Ala	Ile	Asn	Leu	Asn
		85		90		95	
GGA	AAC	CAG	CCT	GTC	GGG	GAA	GAC
Gly	Asn	Gln	Pro	Val	Gly	Glu	Asp
		100		105		110	

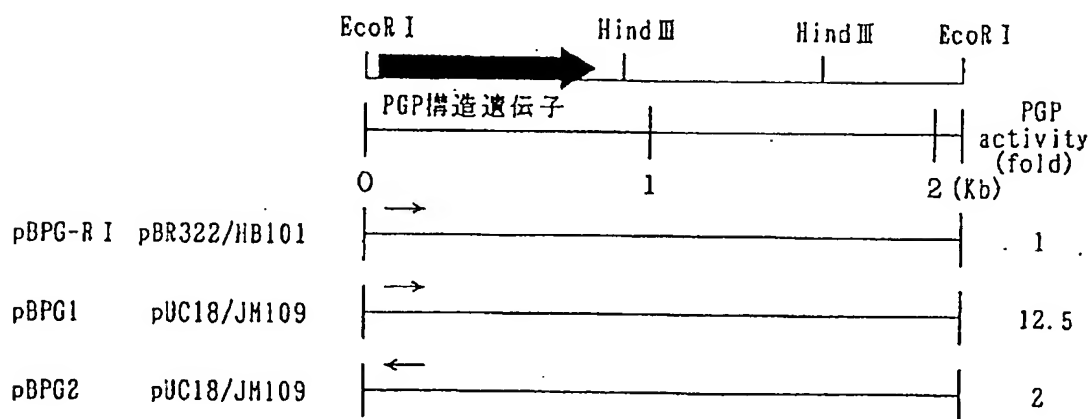
TAT TGG ACC GGC CTT CCG ATC AAA CGG ATC GTT GAG GAG ATT AAA AAA	464
Tyr Trp Thr Gly Leu Pro Ile Lys Arg Ile Val Glu Glu Ile Lys Lys	
115 120 125	
GAA GGC ATT CCC GCG GCT GTA TCC TAC ACG GCG GGG ACG TTT GTA TGC	512
Glu Gly Ile Pro Ala Ala Val Ser Tyr Thr Ala Gly Thr Phe Val Cis	
130 135 140	
AAT CAT CTC TTT TAC GGG CTG ATG GAT GAA ATC AGC CGT CAT CAT CCG	560
Asn His Leu Phe Tyr Gly Leu Met Asp Glu Ile Ser Arg His His Pro	
145 150 155 160	
CAC ATC CGT GGC GGG TTT ATA CAC ATC CCG TAC ATT CCA GAG CAA ACC	608
His Ile Arg Gly Gly Phe Ile His Ile Pro Tyr Ile Pro Glu Gln Thr	
165 170 175	
TTG CAG AAA TCC GCG CCG AGC CTC AGC CTT GAT CAC ATC ACA AAA GCG	656
Leu Gln Lys Ser Ala Pro Ser Leu Ser Leu Asp His Ile Thr Lys Ala	
180 185 190	
CTC AAA ATC GCC GCG GTG ACC GCC GCG GTG CAT GAG GAC GAT ATT GAG	704
Leu Lys Ile Ala Ala Val Thr Ala Ala Val His Glu Asp Asp Ile Glu	
195 200 205	
ACC GGC GGA GGC GAG CTT CAC TAA TT CACTAAGCGG CAGACGGCGT CTCGGCCCAT	760
Thr Gly Gly Gly Glu Leu His	
210 215	
TTCTTTCGGT AAACGATGCG GGACAGCGTC ACACTGATTT CGTAGAGGAC GAGCAGCGGA	820
ATCATGACGA GAAAGTCAGA CATAAAATCG GGCGGCGTAA TCAGCACCGA GACAACGATC	880
AGCAAAAAAT ACGAA	895

【図面の簡単な説明】

入DNA及び各PGP生産性を示す。

【図1】 pBPG-R、pBPG1、pBPG2の挿

【図1】



→ : lac orientation